

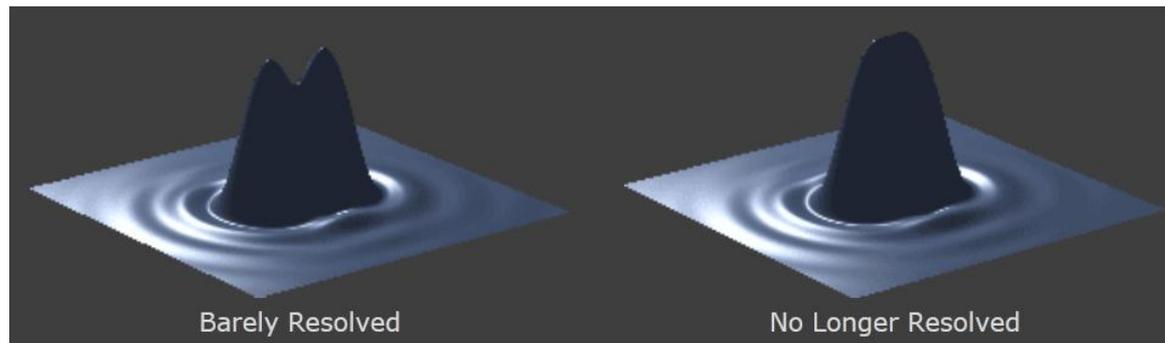
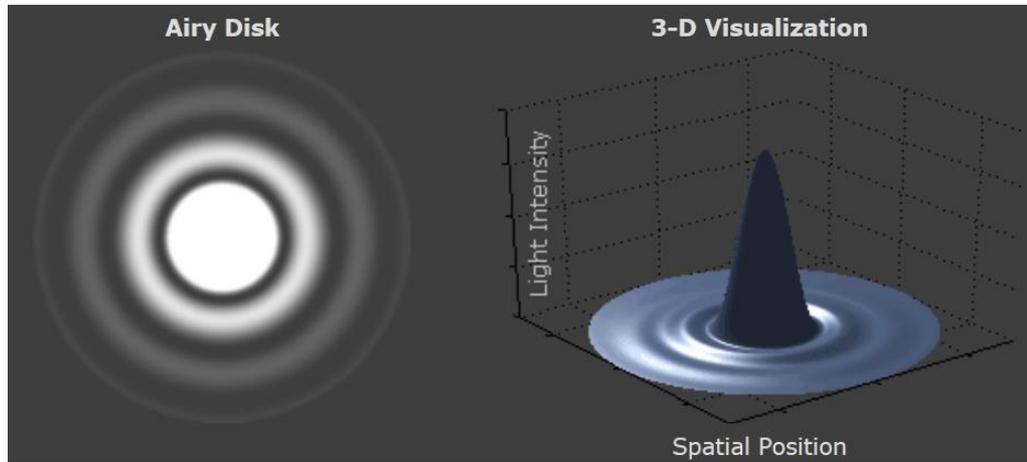
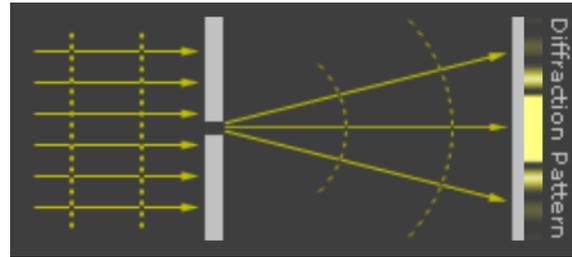


# Resolución, localización y colocalización en sistemas limitados por la difracción de la luz I

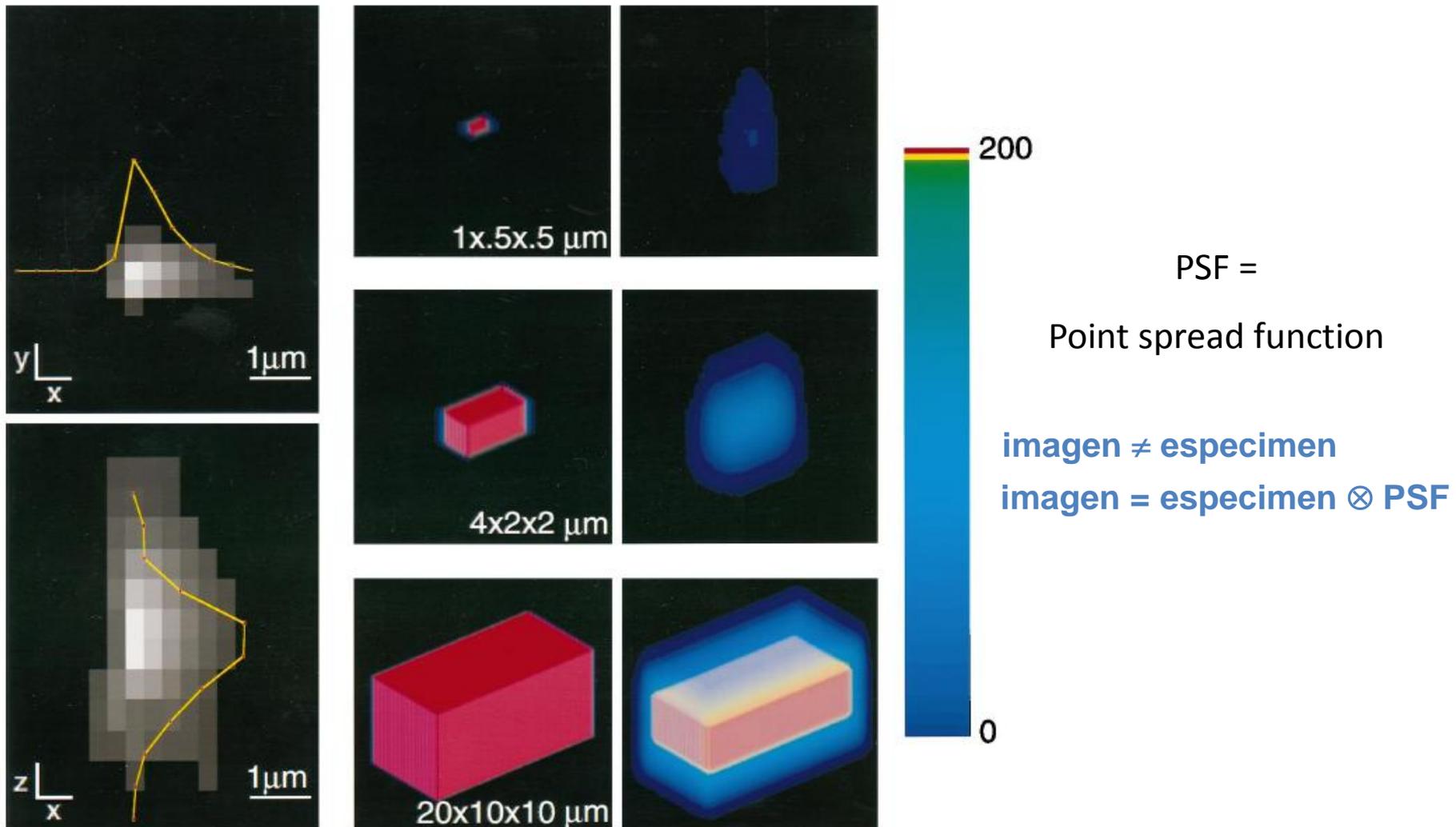
Omar Ramírez

SCIAN-Lab  
Biomedical Neuroscience Institute BNI  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

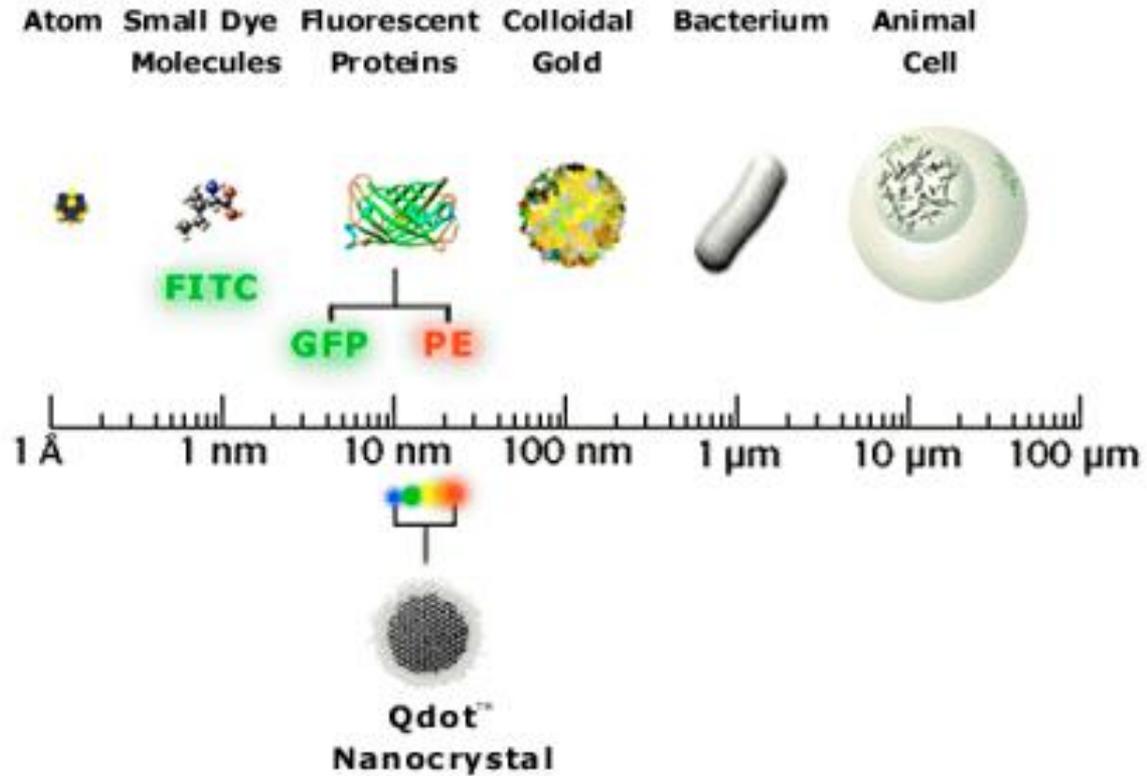
# La difracción de la luz determina el límite de resolución



# Convolución y deconvolución en microscopia de fluorescencia

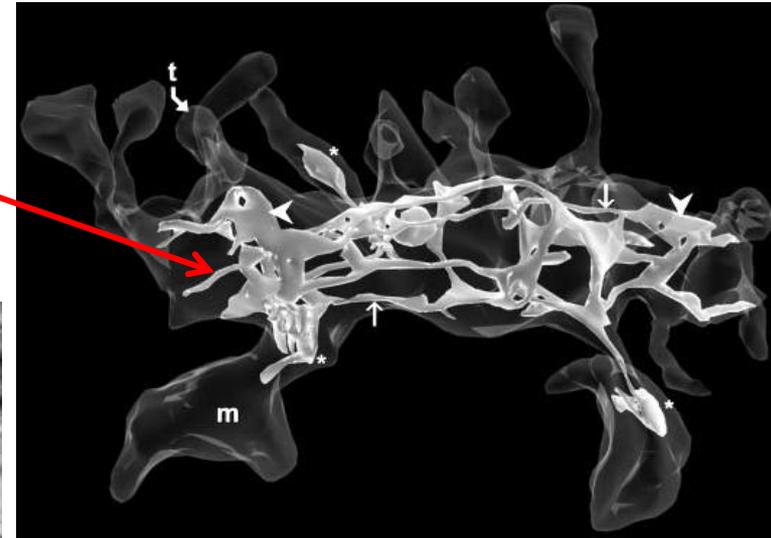
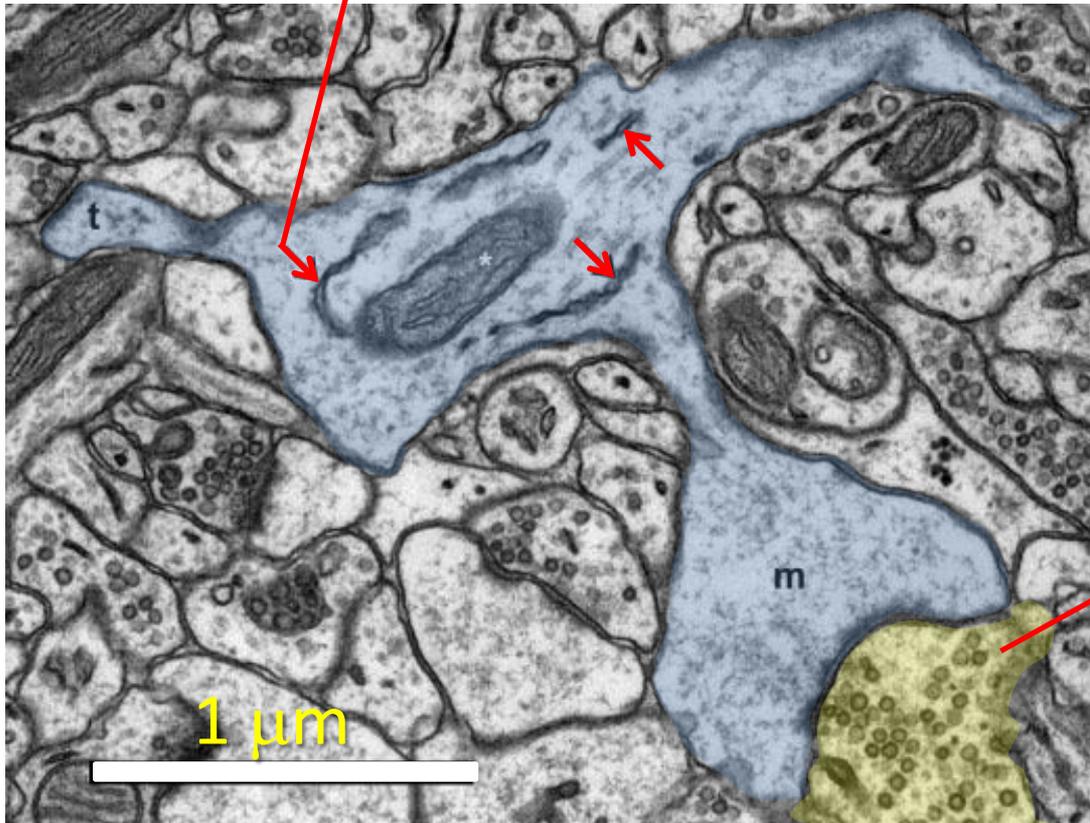


¿Importa el tamaño cuando se trata de resolución en microscopía óptica?



¿Qué pasa con las estructuras de menor tamaño que el límite de la resolución?

El diámetro de un túbulo de RE es < 40 nm, lejos de los ~ 250 nm de resolución de la óptica convencional



El diámetro de una vesícula sináptica es ~ 40 nm.

¿Localización y/o colocación?

# Aberraciones de la PSF en imágenes de microscopia confocal

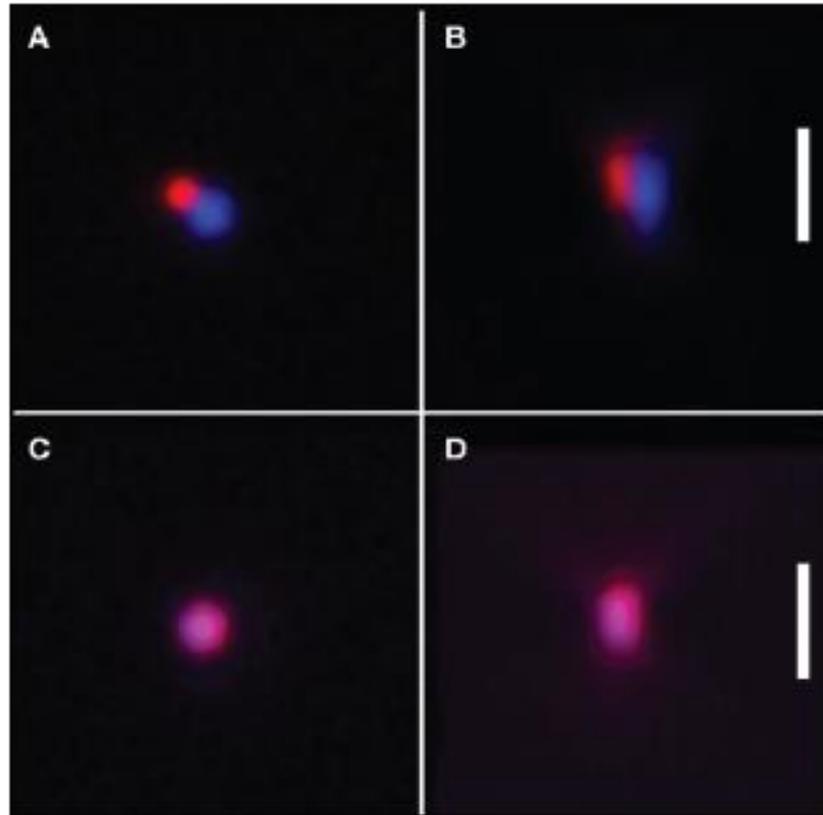
*Especimen:*

Esferas fluorescentes  
de  $170\ \mu\text{m}$

*Objectives:*

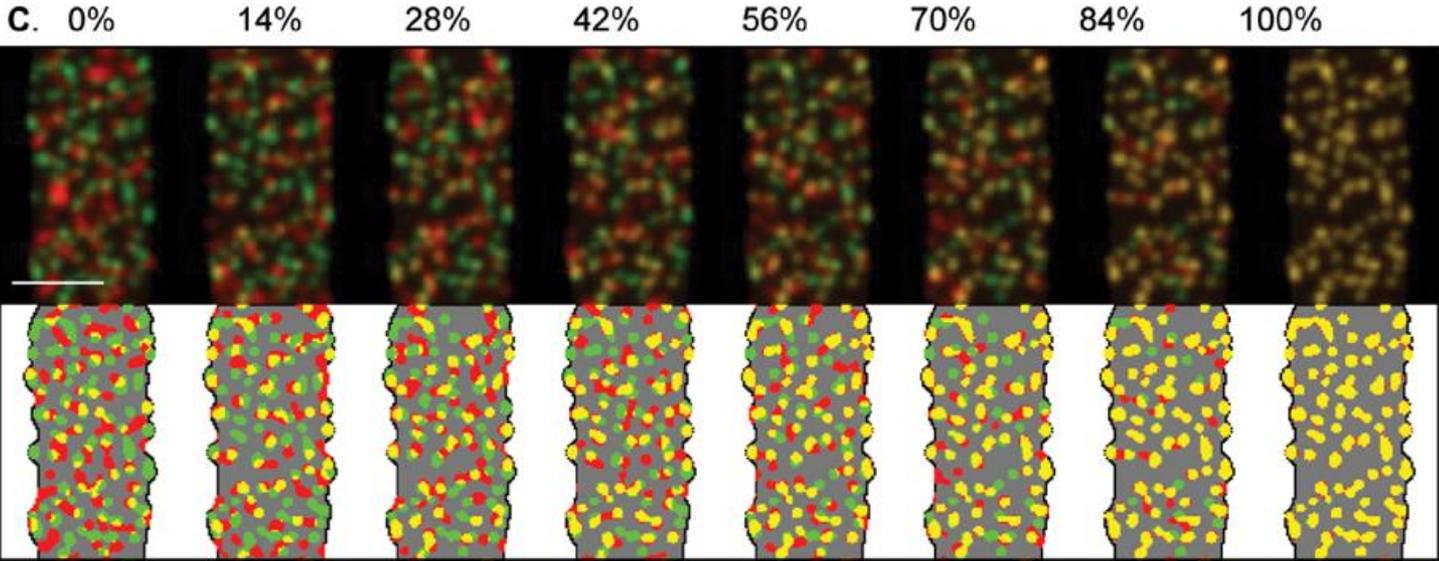
100x 1.4 NA (PlanAPO  
del mismo fabricante).

*Barra:*  $1\ \mu\text{m}$



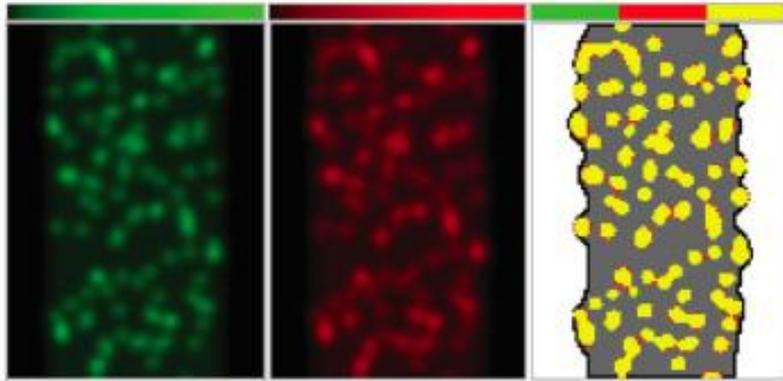
← Aberración  
cromática en XY y  
en Z

# Discriminación visual de estructuras fluorescentes puntuales en microscopía de fluorescencia

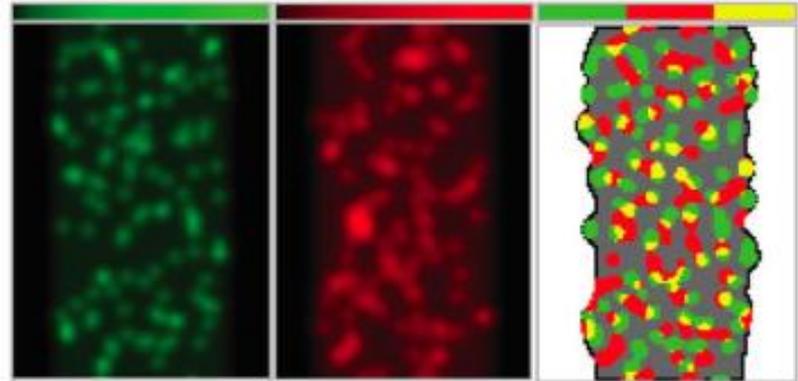


# Cálculo de colocalización y CDA

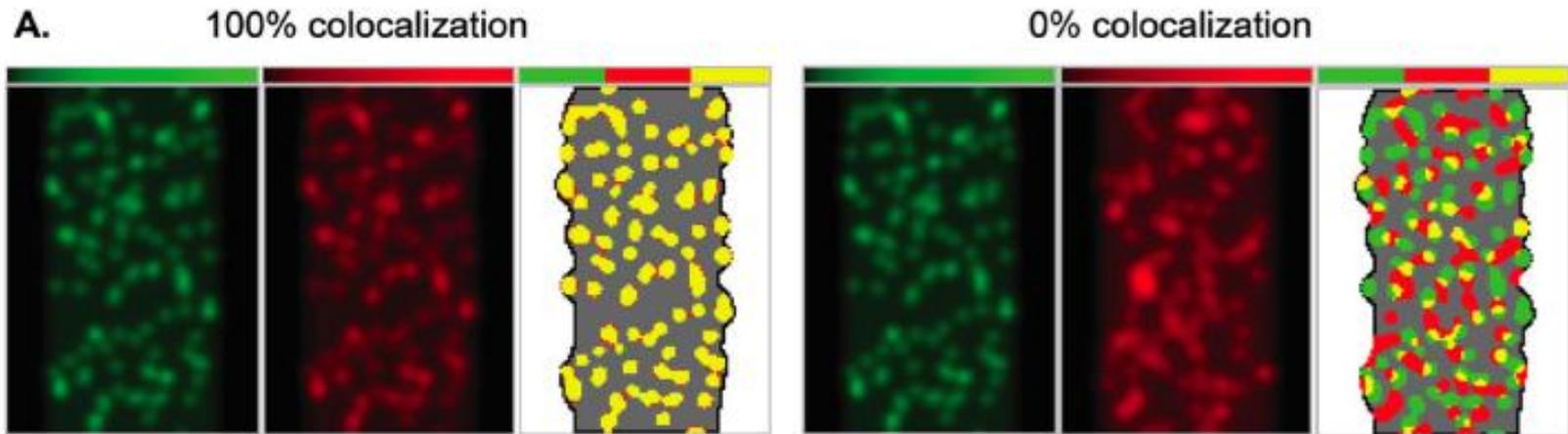
A. 100% colocalization



0% colocalization



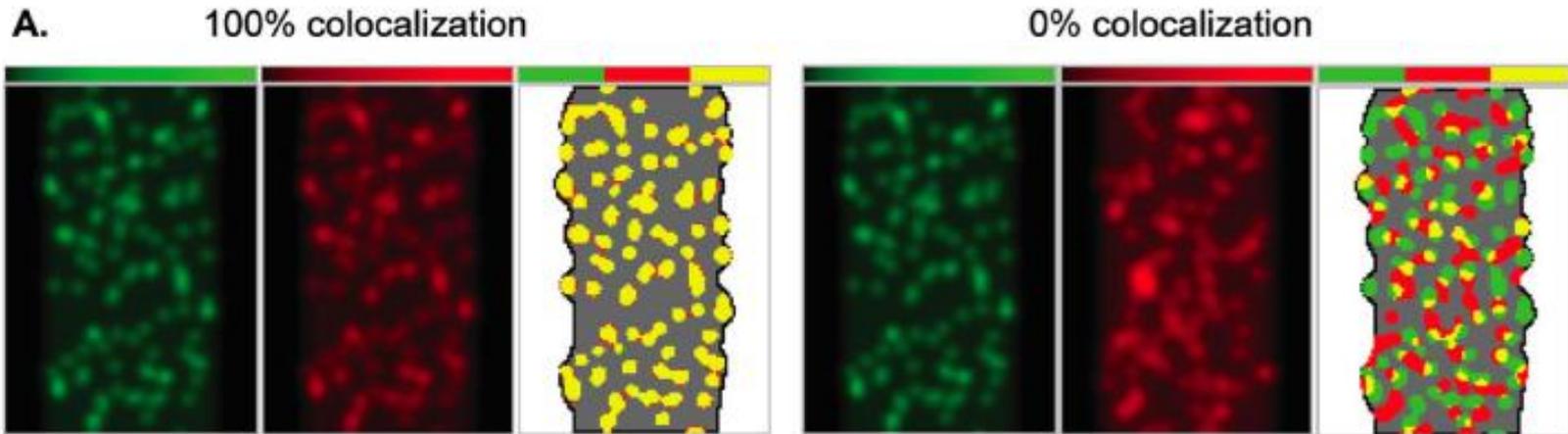
# Cálculo de colocalización y DDA



$$M1_{ROI} = \frac{\sum_{ij} I_{Ch1(ROI1(xi,yj) \cap ROI2(xi,yj))}}{\sum_{ij} I_{Ch1(ROI1(xi,yj))}}$$

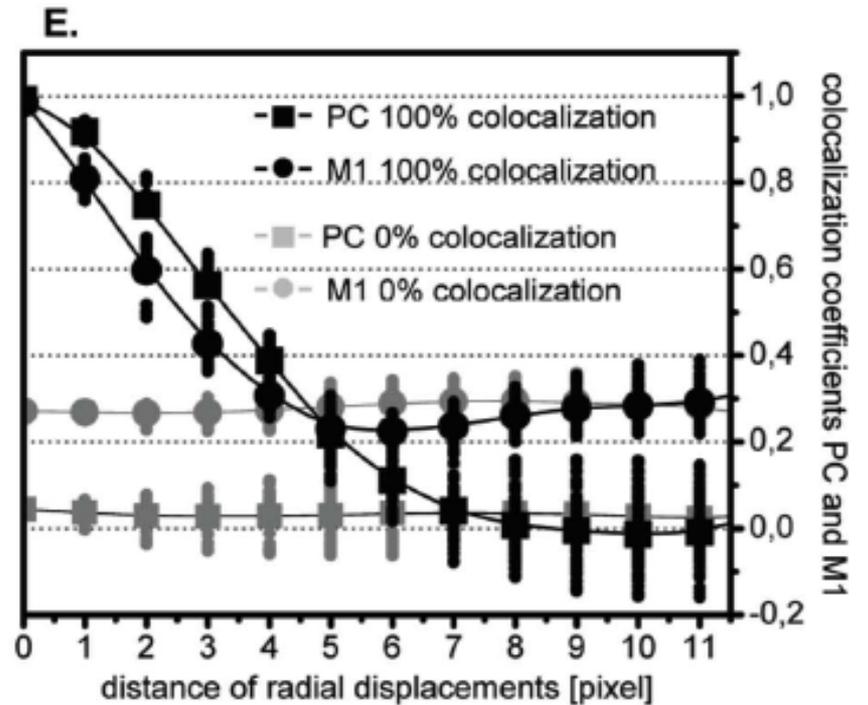
$$M2_{ROI} = \frac{\sum_{ij} I_{Ch2(ROI1(xi,yj) \cap ROI2(xi,yj))}}{\sum_{ij} I_{Ch2(ROI2(xi,yj))}}$$

# Cálculo de colocalización y CDA



$$M1_{ROI} = \frac{\sum_{ij} I_{Ch1(ROI1(xi,yj) \cap ROI2(xi,yj))}}{\sum_{ij} I_{Ch1(ROI1(xi,yj))}}$$

$$M2_{ROI} = \frac{\sum_{ij} I_{Ch2(ROI1(xi,yj) \cap ROI2(xi,yj))}}{\sum_{ij} I_{Ch2(ROI2(xi,yj))}}$$

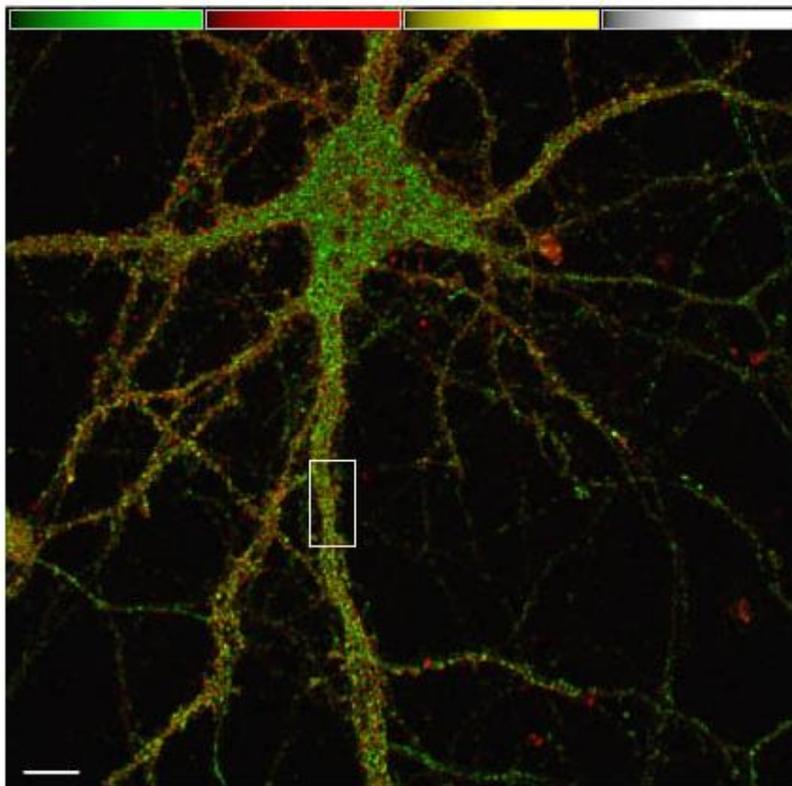


## Etapas del procedimiento

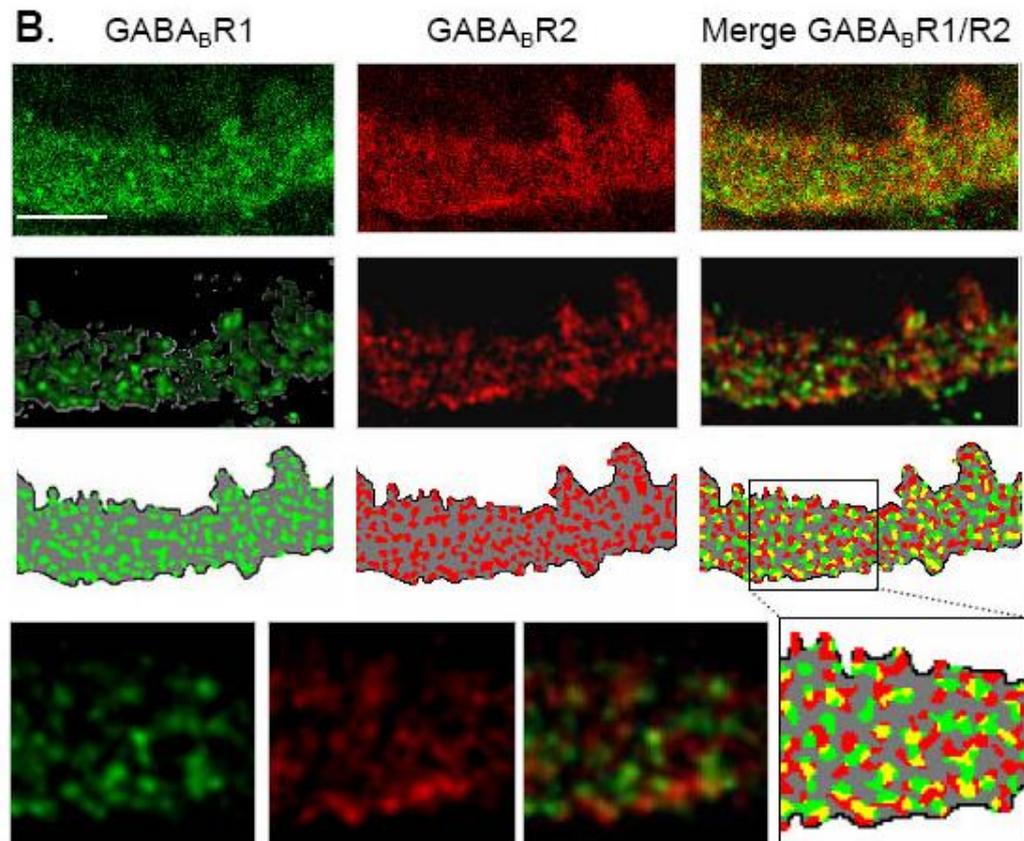
1. DECONVOLUCIÓN
2. SEGMENTACIÓN
3. COEFICIENTE DE COLOCALIZACIÓN (MANDERS)
4. VALIDACIÓN ESTADÍSTICA
5. CONFINAMIENTO SUBCELULAR

# Deconvolución de las señales fluorescentes de GABA<sub>B</sub>R1/R2

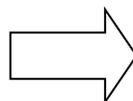
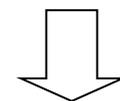
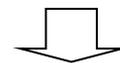
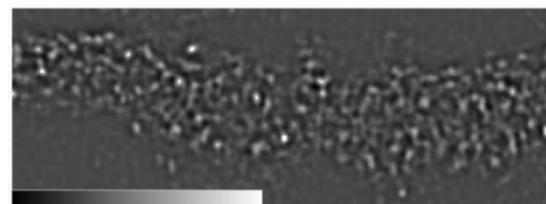
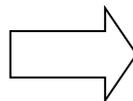
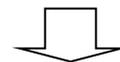
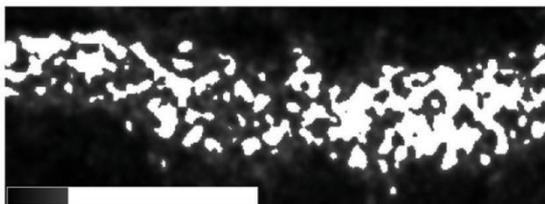
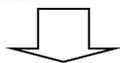
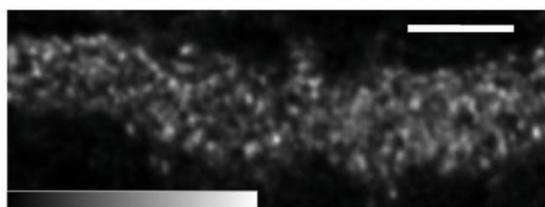
A.



B.



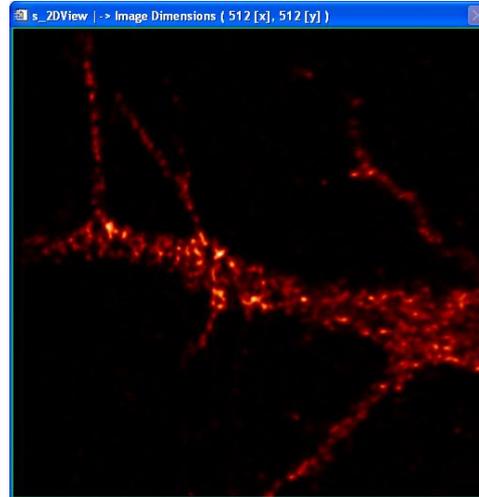
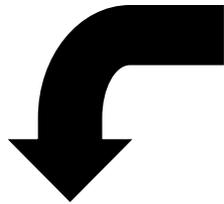
# Segmentación de las señales de GABA<sub>B</sub>R1/R2 en dendritas a partir de imágenes confocales



# Segmentación y confinamiento para el cálculo de colocación

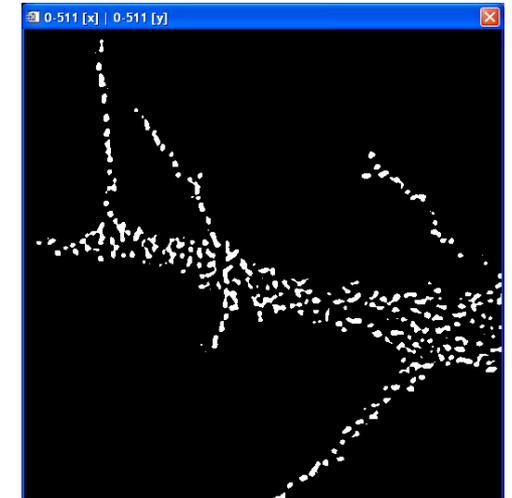
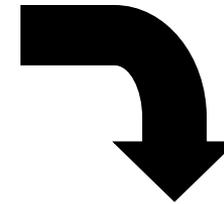
SEGMENTACION

1



SEGMENTACION

2



Elección de un coeficiente de colocación apropiado:

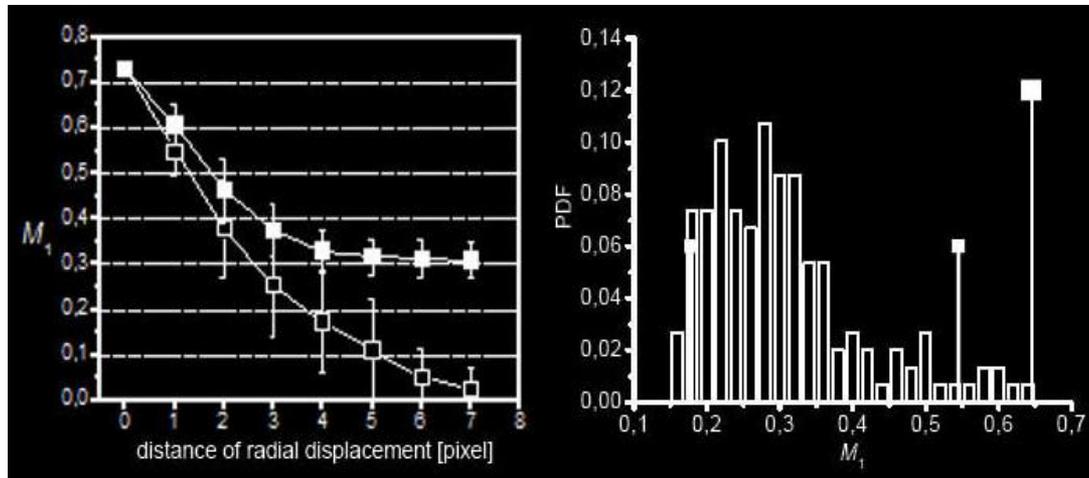
## Coeficientes de Manders

$$M_1 = \frac{\sum_i I_{Ch1(ROI1 \cap ROI2)}}{\sum_i I_{Ch1(ROI1)}}, \quad M_2 = \frac{\sum_i I_{Ch2(ROI1 \cap ROI2)}}{\sum_i I_{Ch2(ROI2)}}$$

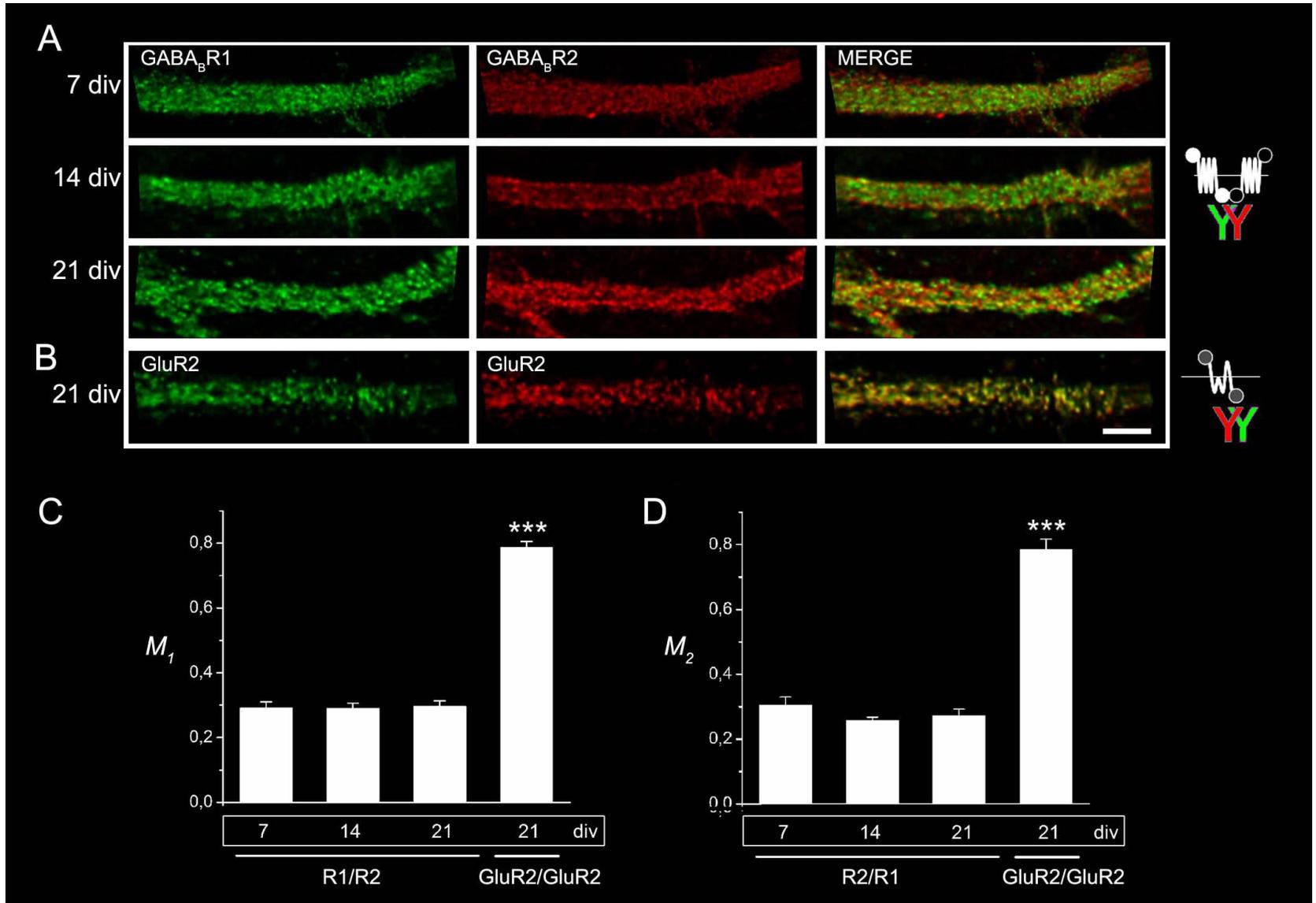
Información derivada de M1/M2 y sus componentes:

1. Cantidad de señal1/2 que está presente dentro de una estructura dada ( $I_{ch1/2}(ROI1/2)$ )
2. Cantidad de señal1/2 que colocaliza con la otra ( $I_{ch1/2}(ROI1 \cap ROI2)$ )
3. Entrega las respectivas fracciones de señales colocalizadas o no colocalizadas (M1/M2)

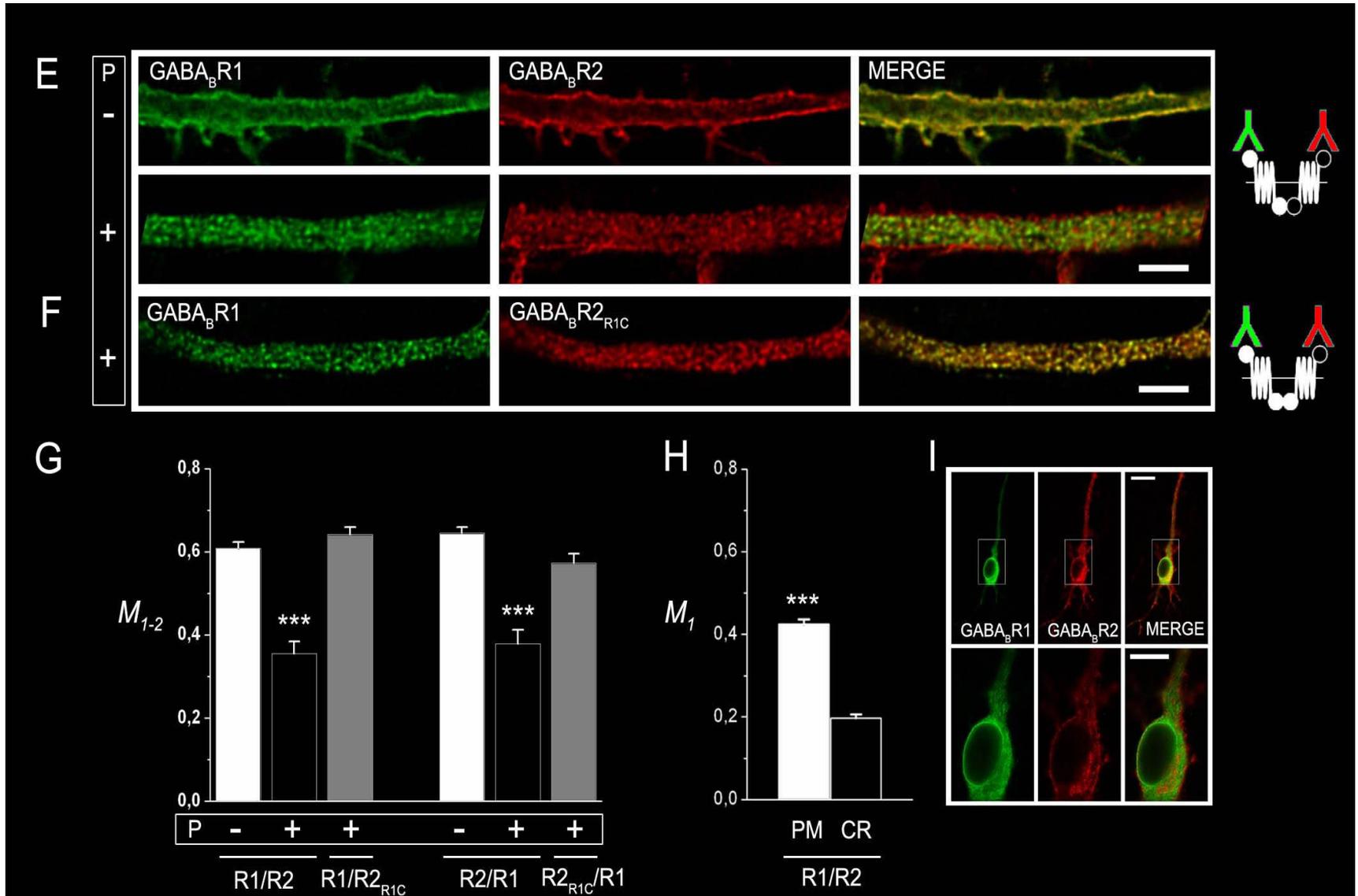
# Significancia estadística de la colocación: Algoritmo de confinamiento definido (CDA)



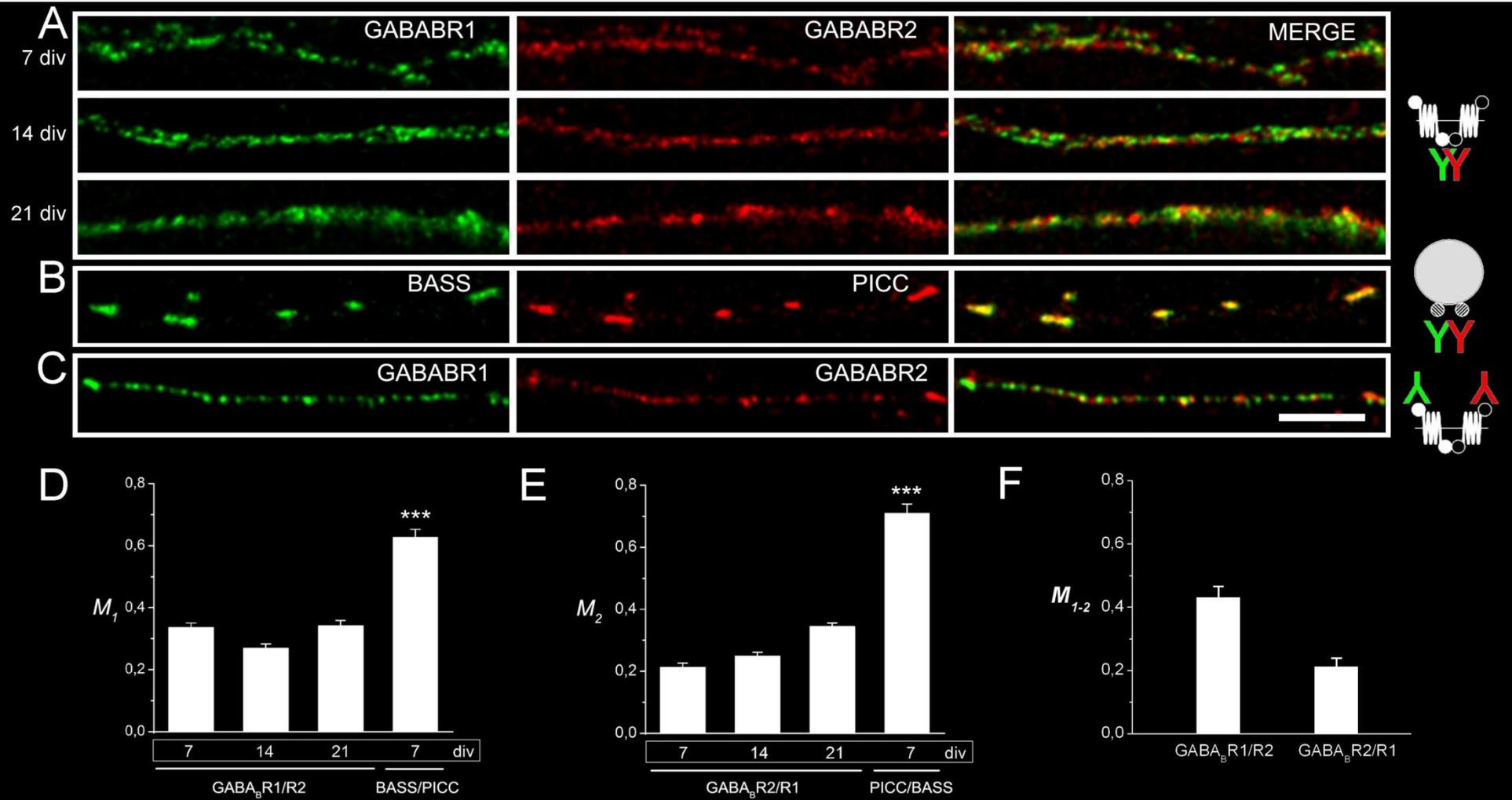
# Las subunidades GABA<sub>B</sub>R1 y GABA<sub>B</sub>R2 están segregadas en compartimientos intracelulares de dendritas primarias



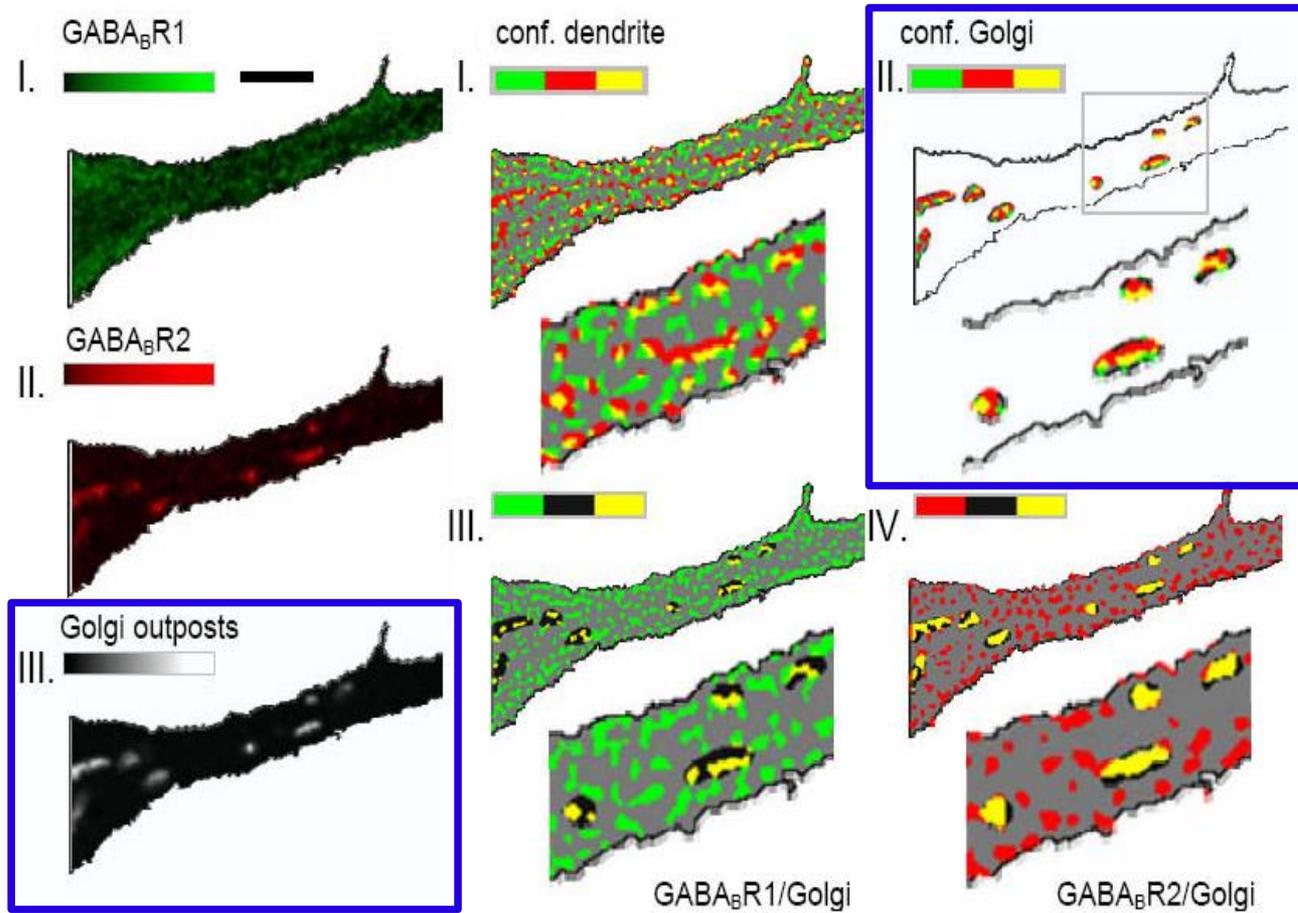
# Las subunidades GABA<sub>B</sub>R1 y GABA<sub>B</sub>R2 están segregadas en compartimientos intracelulares de dendritas primarias



# GABA<sub>B</sub>R1 y GABA<sub>B</sub>R2 existen como homómeros y no cambian su colocalización durante la maduración neuronal en axones



# Golgi satellites



# Retículo endoplasmático

